

令和元年9月17日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293197

研究課題名(和文) アノキス抵抗性に基づいた網羅的な肺癌ドライバー遺伝子特定の研究

研究課題名(英文) Identification of driver genes in lung cancer through a semi-genome wide shRNA library screen based on anoikis resistance phenotype

研究代表者

佐藤 光夫 (Sato, Mitsuo)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70467281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌の新規治療標的の発見を目的とした。まず(1)正常ヒト気管支上皮細胞発癌モデル(HBEC)を用い、癌細胞の代表的な悪性形質であるアノキス(アポトーシスの一種)への抵抗性に基づいたプールshRNAライブラリーによる網羅的な腫瘍抑制遺伝子の特定を行った。HBECのアノキス抵抗性に寄与する遺伝子としてRNF146を特定したが、その結果は肺癌細胞株では再現されなかった。次に、(2)肺癌細胞株H460を用いて、プールshRNAライブラリーによる網羅的ノックダウンと遺伝子発現およびコピー数解析の統合解析を実施した。肺癌の新規治療標的としてプロテアソームサブユニット遺伝子PSMA6を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌は難治癌の代表であり、新しい有効な治療方法の開発は社会的に重要な課題である。本研究は肺癌の新規治療標的の発見を目的とした。肺癌細胞株を用いて、プールshRNAライブラリーによる網羅的ノックダウン手法を用いた機能的なスクリーニングと肺癌における遺伝子発現量およびコピー数の統合解析を実施した。その結果、肺癌の新規治療標的としてプロテアソームサブユニット遺伝子PSMA6を同定し、結果を論文発表した。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to identify novel therapeutic targets for lung cancer.

To this end, we employed two approaches. First, we tried to identify genes that contribute to anoikis resistance by doing shRNA library screen using an immortalized normal human bronchial epithelial cell line, HBEC. Anoikis is a special type of apoptosis induced by loss of attachment to extra cellular matrix, and resistance against anoikis is one of critical malignant properties of cancer cells. We identified RNF146 as a gene whose loss could contribute to anoikis resistance in HBEC. However, this result was not reproduced in lung cancer cell lines. Second, we did an integrated analysis combining a shRNA library screen with utilization of gene expression and copy number analysis using an aggressive lung cancer cell line, H460. We identified proteasome subunit gene PSMA6 as a novel therapeutic target for lung cancer.

研究分野：肺癌

キーワード：肺癌 アノキス プールshRNAライブラリー プロテアソーム

1. 研究開始当初の背景

肺癌に対する有効な分子標的治療薬を開発するには、肺癌の悪性形質獲得の直接的原因となる遺伝子、つまり治療の“標的”となるドライバー遺伝子の特定が必要である。

網羅的なドライバー遺伝子特定のためには、癌細胞の代表的な悪性形質獲得に基づいた機能的なスクリーニングが必要である。さらに、スクリーニングの信頼性を高めるためには、使用するモデル細胞がヒト発癌過程の再現性に優れる必要がある。

研究代表者は肺癌の多段階発癌過程の解明を目的とし、テロメラーゼと cyclin dependent kinase 4 (CDK4) 導入により樹立した正常ヒト気管支上皮細胞 (HBEC) を用いた肺癌の癌化モデルを樹立した (Sato et al. *Cancer Res* 2006)。さらに、代表者は HBEC を使用して、ヒト肺癌発生過程の *in vitro* 再現を5つの癌関連遺伝子導入によるすべての病理像の再現により世界で初めて報告した (Sato et al. *Mol Cancer Res* 2013)。以上は、HBEC モデルがヒト肺癌の発癌モデルとして優れている事を示す。

以上の学術的背景に基づき、本研究はモデル細胞に HBEC を使用し、機能的スクリーニングに用いる表現型に癌細胞の代表的な悪性形質である“接着喪失性アポトーシス (アノキス) 抵抗性獲得”を用いる腫瘍抑制性のドライバー遺伝子の特定を目的とした。

2. 研究の目的

HBEC を用い、アノキス抵抗性に基づいた網羅的な腫瘍抑制ドライバー遺伝子の特定を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞株と培養条件

不死化正常気管支上皮細胞株 HBEC3 および肺癌細胞株 H460, H1299 H661 を使用。HBEC3 は無血清培地 KSFM を使用。H460, H1299 H661 は 10% 血清添加 RPMI1640 培地を使用。

(2) 遺伝子導入実験

HBEC3 への変異型 KRASV12 導入はレンチウイルスベクター pLenti6-KRAS^{V12} を使用した。HBEC3 細胞への PSMA6 遺伝子導入は、レンチウイルスベクター pLenti6-PSMA6 を使用した。

(3) レンチウイルス作成

プールレンチウイルスライブラリーである DECIPHER library human Module 1 (DHPAC-M1-P) (Collecta Inc.) は 5,043 遺伝子を網羅し、一遺伝子につき 4 から 6 の異なるシーケンス配列の shRNA ベクターを含む。DHPAC-M1-P Packaging Plasmid Mix (Collecta Inc.) と DHPAC-M1-P を 293FT 細胞に同時にトランスフェクションし上清からレンチウイルスを回収した。

(4) プール型 shRNA レンチウイルスライブラリーによるスクリーニング

2 種類のスクリーニングを実施した。

<スクリーニング 1> HBEC3 細胞を使用し、アノキス抵抗性獲得に関与する遺伝子の同定を目的とした。

HBEC3 に変異型 KRASV12 を導入し安定発現細胞 HBEC3K を樹立。HBEC3K 細胞に DHPAC-M1-P のウイルスを感染したのち通常のプラスチック培養条件 (2 次元培養) および超非接着培養条件 (3 次元培養) にて培養した。次世代シーケンサーによって個々の shRNA の定量を行った。2 次元培養と 3 次元培養との比較によりアノキス抵抗性獲得に関与する遺伝子を同定した。

<スクリーニング 2> 肺癌細胞 H460 をモデルとして新規の肺癌治療標的の同定を目的とした。H460 細胞に DHPAC-M1-P ウイルスを感染したのち次世代シーケンサーによって個々の shRNA を定量した。ウイルス作成に使用したベースラインのライブラリーにおける個々の shRNA 数をコントロールとしてウイルス導入後の shRNA 数との比較を行った。個々の遺伝子のノックダウンが肺癌細胞の増殖に与える影響を評価した。

(5) マイクロアレイ発現解析

163 個の非小細胞肺癌細胞株と 59 個の正常コントロール細胞株を使用。Illumina Human WG-6 v3.0 Expression BeadChip を使用。RNA の増幅、ハイブリダイゼーション、データ解析は共同研究者であるテキサス大学 Dr Minna 研究室にて実施した。

(6) DNA コピー数解析

108 の非小細胞肺癌株を使用。解析データを共同研究者であるテキサス大学 Dr Minna 研究室から取得した。

(7) プロテアソーム活性測定

プロテアソーム活性を 20S proteasome activity assay kit (Merck Millipore, Temecula, CA) を使用して測定した。

(8) ウェスタンブロット

全細胞溶解物を用いてウェスタンブロットを実施した。

(9) 合成 RNA 干渉オリゴのトランスフェクション

Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を使用して合成 RNA 干渉オリゴのトランスフェクションを実施した。

(10) 免疫組織学的染色

文書による同意を取得した患者より切除した肺癌組織と隣接する正常肺を使用した。抗 PSMA6 抗体 (Cell Signaling Technology) を用いて実施した。

(11) 細胞増殖アッセイ

WST-1 Assay Kit (Roche, Basel, Switzerland) を用いて細胞増殖を定量した。

(12) 細胞周期解析

細胞から抽出した DNA を propidium iodide にて染色したのち flow FACS Gallios flow cytometer にて細胞周期解析を実施した。

(13) 統計解析

IBM SPSS version 23 software (International Business Machines Corp., Armonk, New York, USA) を使用した。2 グループの比較検定には Mann-Whitney U テストを用いた。

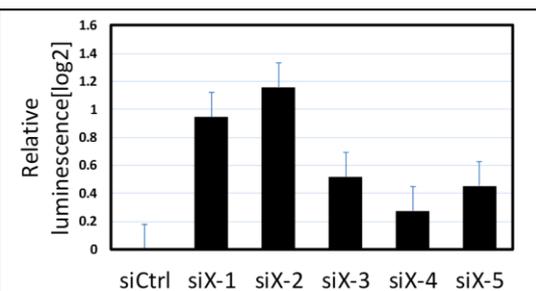
4. 研究成果

(1) shRNA ライブラリーによるスクリーニング

<スクリーニング 1>

HBEC3 細胞にレンチウイルスベクター pLenti6-KRAS^{V12} を使用して変異型 KRASV12 を導入した。導入細胞を HBEC3K とした。HBEC3K において網羅的遺伝子ノックダウンを行った。次に、通常のプラスチック培養条件 (2 次元培養) および超非接着培養条件 (3 次元培養) にて培養した。DNA を抽出し次世代シーケンサーによって個々の shRNA を定量した。2 次元培養と 3 次元培養との比較によりアノキス抵抗性獲得に関与する候補遺伝子を複数特定した。候補遺伝子の個別ノックダウンを行うことにより、アノキス抵抗性の確認実験を行った。HBEC3K 細胞に対し、siRNA を用いて個々の候補遺伝子をノックダウンし、3 次元培養での細胞増殖を検証することでアノキス抵抗性を確認した。その結果、RNF146 のノックダウンによって、3 次元培養におけるアノキス抵抗性の獲得を認めた (図 1)。しかし、肺癌細胞株においてはこの結果の再現性を認めなかった。

<スクリーニング 2>

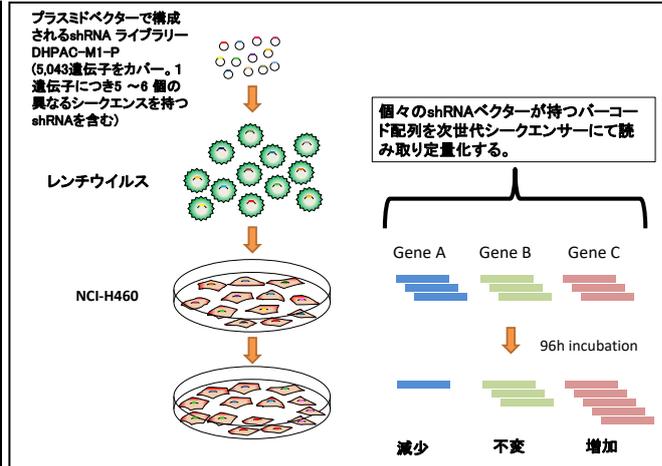


【図 1】RNF146 のノックダウンが HBEC3K 細胞の 3D 培養において増殖に与える影響

HBEC3K 細胞を使用。5 種類の異なる配列のノックダウンオリゴを使用した。ノックダウン後、5 日後に、3D 培養における増殖を評価した。5 種類のノックダウンオリゴの導入はいずれもコントロールと比較し増殖を促進した。

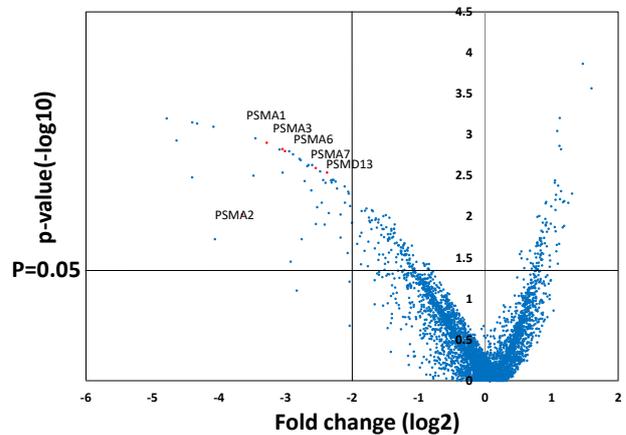
肺癌細胞 H460 をモデルとして新規の肺癌治療標的の同定を目的とした (図 2)。

H460 細胞に DHPAC-M1-P ウイルスを感染したのち次世代シーケンサーによって個々の



【図 2】肺癌細胞 H460 を用いたプール shRNA ライブラリースクリーニングの流れ図

プラスミドベクターで構成される shRNA ライブラリー DHPAC-M1-P (5,043 遺伝子をカバー。1 遺伝子につき 5 ~ 6 個の異なるシーケンスを持つ shRNA を含む) からレンチウイルスを作成。ウイルスを肺癌細胞 H460 に感染。培養後、細胞を回収し DNA を抽出。個々の shRNA に組み込み済みのバーコード配列を次世代シーケンサーにて読み取ることで個々の shRNA を定量した。図中の遺伝子 A、B、C のように shRNA 量が減少、不変、増加した遺伝子は、それらの遺伝子のノックダウンが増殖に対してそれぞれ、抑制、不変、促進作用を持つと解釈した。



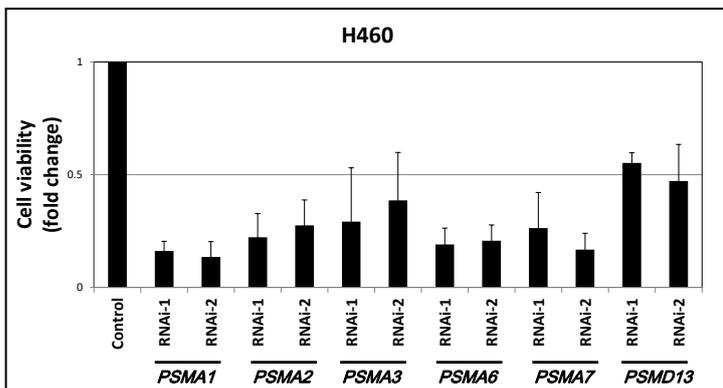
【図 3】ボルケーノプロットにて示される肺癌細胞 H460 におけるプール shRNA ライブラリーのスクリーニング結果

H460 細胞に DHPAC-M1-P のウイルスを感染したのち次世代シーケンサーによって個々の shRNA の定量を行った。ベースラインのライブラリーにおける個々の shRNA 数をコントロールとしてウイルス導入後の shRNA 数との比較を行った。横軸はベースラインを基準とした shRNA 量の変化率を示す。縦軸はコントロール遺伝子であるルシフェラーゼ遺伝子との t 検定によって算出した P 値に -1 を乗じた値を示す。左上方 (変化率 $-2\log_2$ 未満かつ P 値 0.05 未満) の長方形の領域を含む 51 遺伝子をノックダウンが有意に増殖を抑制した遺伝子と解釈した。

shRNA の定量を行った。ウイルス作成に使用したベースラインのライブラリーにおける個々の shRNA 数をコントロールとしてウイルス導入後の shRNA 数との比較を行った。個々の遺伝子のノックダウンが肺癌細胞の増殖に与える影響を評価した。結果をボルケーノプロットとして図 3 に示す。変化率 $-2\log_2$ 未満 (25% 未満) かつ P 値 0.05 未満である 51 遺伝子を治療標的の候補遺伝子とした。

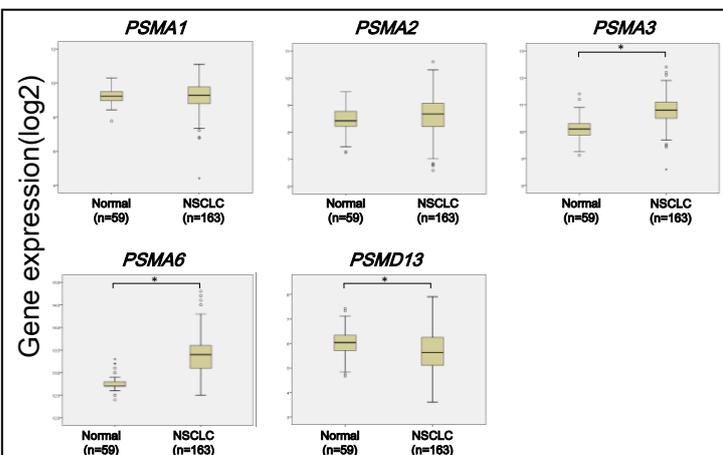
(2) 候補遺伝子のパスウェイ解析

上記にて同定した 51 遺伝子がどのパスウェイに属する遺伝子を統計学的により有意に多く含むかを調べるために、パスウェイ解析



【図4】RNA干渉によるプロテアソーム遺伝子のノックダウンがH460の増殖に与える影響

H460細胞において、治療標的候補として同定された6つのプロテアソーム遺伝子の個別ノックダウンを実施した。細胞増殖をWST1アッセイにて評価した



【図5】プロテアソーム遺伝子の肺癌および正常コントロール細胞株におけるmRNA発現
163個の非小細胞肺癌細胞株と59個の正常コントロール細胞株を使用。Illumina Human WG-6 v3.0 Expression BeadChipを使用。* $P < 0.001$ (Mann-Whitney U test)

を行った。オンラインツールである NIH-DAVID を用いた。51 遺伝子が 5 つのパスウェイに含まれる遺伝子を有意により多く含むことを見出した。5 つのパスウェイはリボソームパスウェイ、プロテアソームパスウェイ、RNA ポリメラーゼパスウェイ、ピリミジン代謝パスウェイ、スプライソソームパスウェイであった。我々は、プロテアソームパスウェイに注目した。なぜなら、プロテアソームパスウェイは多種類の癌細胞において特異的に活性化しており、また、実地臨床において多発性骨髄腫に対するプロテアソーム阻害薬ボルテゾミブが使用されているからである。プロテアソームパスウェイは 26S プロテアソームを構成サブユニット遺伝子 6 つ (*PSMA1*, *PSMA2*, *PSMA3*, *PSMA6*, *PSMA7*, *PSMD13*) と DNA 修復とプロテアソームの構築に関わる *SHFM1* を含んだ。*SHFM1* については胃癌や乳癌における発癌性の機能がすでに報告されているため本研究の解析対象からは除外した。スクリーニング結果の確認のために、同定された 6 つの 26 プロテアソーム構成サブユニット遺伝子の個別ノックダウンを行い、増殖に与える影響を WST アッセイ

にて評価した。結果は 6 遺伝子すべてにおいてノックダウンは H460 細胞の増殖を抑制した (図 4)。

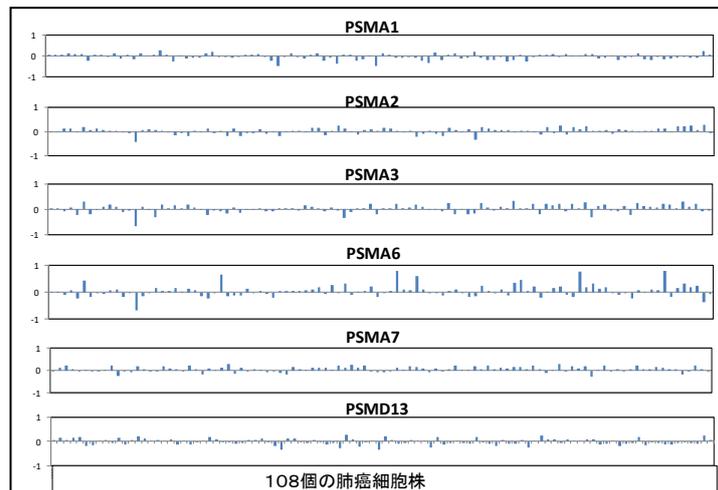
(3) 同定された 6 つの 26 プロテアソーム構成サブユニット遺伝子の発現解析

治療標的として同定された 6 つの 26 プロテアソームを構成サブユニット遺伝子の発現解析を行った。共同研究者であるテキサス大学 Minna lab から提供された肺癌および正常気管支上皮細胞株のマイクロアレイデータを使用して 6 つの遺伝子の mRNA 発現を調べた。結果は正常コントロールと比較し PSMA3 と PSMA6 は肺癌において発現増加があり、一方で PSMD13 は発現減少があった (図 5)。

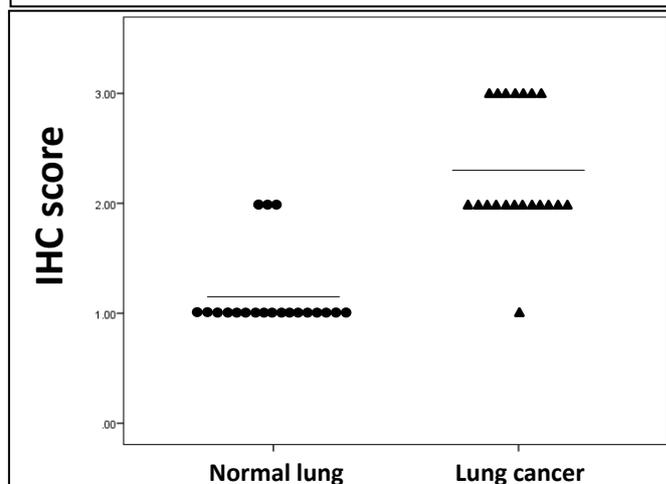
(4) 同定された 6 つの 26 プロテアソーム構成サブユニット遺伝子のコピー数解析

108 の非小細胞肺癌株を使用してコピー数解析を行った。結果は、PSMA6 のみコピー数増加を認めた (図 6)。

以上の結果より PSMA6 が最も有望な治療標的であると判断し、PSMA6 についてさらなる



【図6】プロテアソーム遺伝子の肺癌細胞株におけるコピー数解析
108の非小細胞肺癌株を使用しLarray CGHにてコピー数を解析した。



【図7】肺癌組織標本におけるPSMA6タンパクの免疫組織学的発現解析

20症例からの外科切除非小細胞肺癌組織と隣接する正常肺におけるPSMA6タンパクの発現を免疫組織学的に評価した。

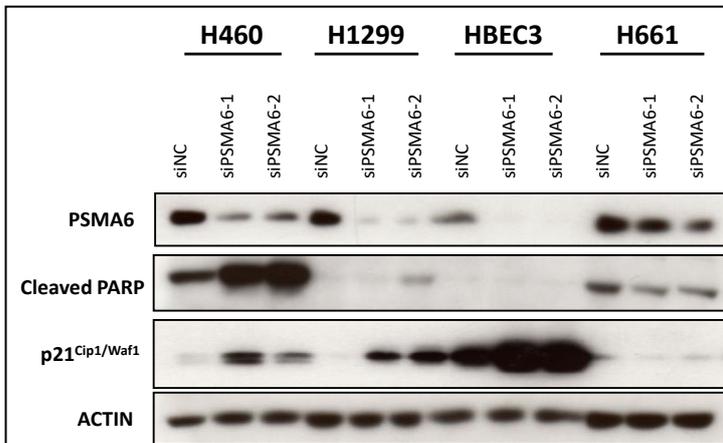
解析を行った。

(5) 外科切除肺癌組織標本における PSMA6 タンパクの発現解析

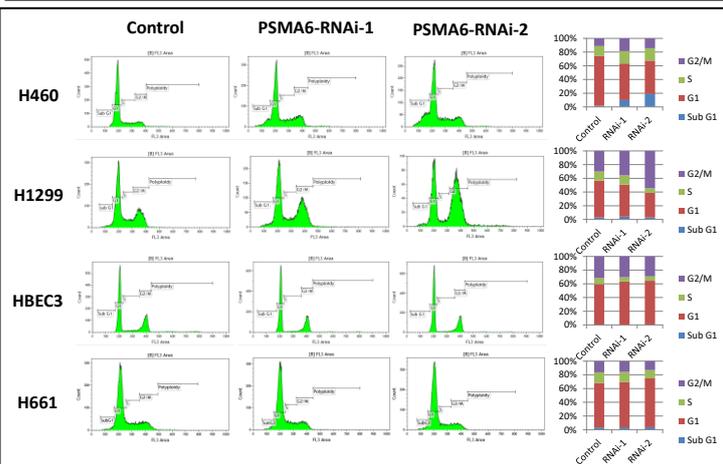
20 症例の外科切除された非小細胞肺癌組織標本とそれぞれにおける正常肺部分を使用して PSMA6 タンパクの発現量を免疫組織学的に評価した。20 症例中 18 例 (90%) において正常肺よりも高いレベルの PSMA6 タンパクの発現を認めた (図 7)。

(6) PSMA6 のノックダウンは肺癌細胞にアポトーシスを誘導する

PSMA6 のノックダウンによる細胞増殖抑制効果の機序解明を目的として切断 PARP のウエスタンブロットを実施した。H460 に加えて、P53 欠失肺癌細胞株である H1299 と PSMA6 遺伝子の増幅肺癌細胞株である H661, 正常コントロールとして HBEC3 を使用した。H460 において PSMA6 ノックダウンはアポトーシスを誘



【図8】PSMA6ノックダウン肺癌細胞におけるアポトーシス解析
PSMA6ノックダウン細胞におけるアポトーシスを切断PARPのウエスタンブロットングにて評価した



【図9】PSMA6ノックダウン肺癌細胞に細胞周期解析
PSMA6ノックダウン細胞における細胞周期を FACS にて解析した。

導した。H1299 においてもわずかながら PSMA6 ノックダウンはアポトーシスを誘導した。一方で、HBEC3 と H661 においてはアポトーシスを誘導しなかった (図 8)。

(7) PSMA6 のノックダウンは肺癌細胞に G2 細胞周期停止を誘導する

PSMA6 のノックダウンによる細胞増殖抑制効果の機序解明を目的として細胞周期解析を実施した。H1299 において PSMA6 ノックダウンは G2 細胞周期停止を誘導した。一方、コントロール HBEC3 とその他の肺癌細胞においては細胞周期停止を誘導しなかった (図 9)。

(8) 成果のまとめ

プール型 shRNA レンチウイルスライブラリーを使用した 2 種類のスクリーニングによって肺癌の治療標的遺伝子として RNF146 および PSMA6 を同定した。

5. 主な発表論文等

【雑誌論文】(計 10 件)

1. Identification of proteasomal catalytic subunit PSMA6 as a therapeutic target for lung cancer. Kakumu T, Sato M, Goto D, Kato T, Yogo N, Hase T, Morise M, Fukui T, Yokoi K, Sekido Y, Girard L, Minna JD, Byers LA, Heymach JV, Coombes KR, Kondo M, Hasegawa Y. *Cancer Sci.* 2017 Apr;108(4):732-743. doi: 10.1111/cas.13185. 査読有
2. Larsen JE, Nathan V, Osborne JK, Farrow RK, Deb D, Sullivan JP, Dospoy PD, Augustyn A, Hight SK, Sato M, Girard L, Behrens C, Wistuba II, Gazdar AF, Hayward NK, Minna JD. ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer. *J Clin Invest.* 2016 Aug 8. doi: 10.1172/JCI76725 査読有
3. Yamashita R¹, Sato M, Kakumu T, Hase T, Yogo N, Maruyama E, Sekido Y, Kondo M, Hasegawa Y. Growth inhibitory effects of miR-221 and miR-222 in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Med.* 2015 Apr;4:551-64. doi: 10.1002/cam4.412. Epub 2015 Jan 30. 査読有
4. Kim J¹, Sato M², Choi JW³, Kim HW³, Yeh BI³, Larsen JE⁴, Minna JD⁵, Cha JH⁶, Jeong Y¹. Nuclear Receptor Expression and Function in Human Lung Cancer Pathogenesis. *PLoS One.* 2015 ;10:e0134842. doi: 10.1371/journal.pone.0134842. eCollection 2015. 査読有
5. Takashima K, Matsushima M, Hashimoto K, Nose H, Sato M, Hashimoto N, Hasegawa Y, Kawabe T. Protective effects of intratracheally administered quercetin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Respir Res.* 2014

21:15:150. doi:

10.1186/s12931-014-0150-x. 査読有

6. Ogawa T, Imaizumi K, Hashimoto I, Shindo Y, Imai N, Uozu S, Shimokata T, Ito S, Hashimoto N, Sato M, Kondo M, Hasegawa Y. Prospective analysis of efficacy and safety of an individualized-midazolam-dosing protocol for sedation during prolonged bronchoscopy. *Respir Investig*. 2014 May;52(3):153-9. doi: 査読有 10.1016/j.resinv.2013.09.003.
7. Murata N, Ito S, Furuya K, Takahara N, Naruse K, Aso H, Kondo M, Sokabe M, Hasegawa Y. Ca²⁺ influx and ATP release mediated by mechanical stretch in human lung fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Oct 10;453(1):101-5. doi:10.1016/j.bbrc.2014.09.063. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

1. Mitsuo Sato, Tomohiko Kakumu, Toshio Kato, Naoyuki Yogo, Tetsunari Hase, Masashi Morise, Takayuki, Fukui, Kohei Yokoi, Luc Girard, John Minna, Masashi Kondo, Yoshinori Hasegawa, Identification of Proteasome Catalytic Subunit PSMA6 as a Therapeutic Target for Lung Cancer, 第 75 回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2016 年 10 月 6 日
2. 馬嶋俊・岡地祥太郎・麻生裕紀・長谷哲成・森瀬昌宏・若原恵子・橋本直純・佐藤光夫・近藤征史・長谷川好規、良性肺末梢性病変に対するEBUS-GS の有用性の検討、第39回呼吸内視鏡学会学術集会、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市) 2016年6月24日
3. 岡地祥太郎・長谷哲成・麻生裕紀・森瀬昌宏・若原恵子・橋本直純・佐藤光夫・近藤征史・長谷川好規 80 歳以上の高齢者に対する気管支鏡、第 39 回呼吸内視鏡学会学術集会、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市) 2016 年 6 月 23 日
4. Toshio Kato, Mitsuo Sato, Masashi Kondo, Tomohiko Kakumu, Naoyuki Yogo, Tetsunari Hase, Masahiro Morise, John D Minna, Yoshinori Hasegawa Cytochrome c oxidase subunit 5a (COX5A) as an attractive target for NSCLC with high therapeutic index, AACR(アメリカ癌学会年次総会)、アメリカ、ニューオリンズ、2016 年 4 月 17 日
5. 第 74 回日本癌学会学術総会 肺がん治

療標的としての CDK11 の可能性

各務智彦、佐藤光夫、加藤俊夫、與語直之、長谷哲成、森瀬昌宏、近藤政史、関戸好孝、長谷川好規 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市) 2015年

10月9日

6. Tomohiko Kakumu, Mitsuo Sato, Toshio Kato, Naoyuki Yogo, Tetsunari Hase, Yoshitaka Sekido, Masashi Kondo, and Yoshinori Hasegawa, **Cyclin-dependent kinase11 (CDK11) is crucial for growth of lung cancer cells**, 第 17 回世界肺癌学会議(WCLC 2015) アメリカ、デンバー、2015 年 9 月 7 日
7. Sato M, Yamashita R, Kakumu T, Yogo N, Hase T, Maruyama E, Sekido Y, Kondo M, and Hasegawa Y, ENA-2014 Symposium, *Tumor suppressive roles of miR-221 and miR-222 in lung cancer*, スペイン, バルセロナ 2014 年 11 月 19 日
8. 佐藤光夫、山下良、各務智彦、長谷哲成、丸山英一、関戸好孝、近藤征史、長谷川好規 非小細胞肺癌治療薬としての miR-221 と miR-222 の可能性 第 73 回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜横浜市 (神奈川県横浜市) 2014 年 9 月 25 日

[図書] (計 1 件)

1. Sato M, Shames DS, Hasegawa Y: MicroRNAs in Transitions: EMT, MET, and EndoMT in In Sen (ed). *Micro RNA in Regenerative Medicine*, Elsevier 2014: (1259) 893-915.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 光夫 (SATO, Mitsuo)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 70467281

(2) 研究分担者

近藤 征史 (KONDO, Masashi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 00378077

長谷 哲成 (HASE, Tetsunari)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号: 30621635

(3) 連携研究者

湯川 博 (YUKAWA, Hiroshi)

名古屋大学・大学院工学系研究科・特任講師

研究者番号: 30634646

横井 香平 (YOKOI, Kohei)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 60378007

(4) 研究協力者

與語 直之 (YOGO, Naoyuki)

名古屋大学・大学院工学研究科・研究員

研究者番号: 70817874